



## Monosynaptic excitatory transmission from the hippocampal CA1 region to the subiculum

Geng, Xiaoqi

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6512号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006512>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

## 学位論文の内容要旨

Monosynaptic excitatory transmission from the hippocampal CA1 region to the subiculum

海馬 CA1 野から海馬支脚への单シナプス興奮性伝達

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
神経生理学  
(指導教員: 森 正弘 准教授)

耿 瀟奇

### 初めに

海馬支脚は空間記憶と動機付けに重要な役割を果たし、側頭葉てんかん、アルツハイマー病や統合失調症などの精神疾患の病因に関与している。海馬支脚主細胞は、CA1 野主細胞からの入力を受けるが、海馬支脚主細胞と CA1 野錐体細胞の両方が場所細胞として空間情報の処理に関与している。CA1 野錐体細胞からの複数の入力を同時に活性化する細胞外刺激を用いて、CA1 野から海馬支脚へのシナプス伝達に関する研究がいくつか報告されているが、単一の CA1 野錐体細胞から単一の海馬支脚主細胞への单シナプス伝達の正確な特性はまだ報告されておらず、機能的な観点では、海馬支脚は CA1 野や CA3 野のような他の海馬領域に比べ、明らかにされていないことが多い。連絡細胞対からのペア記録は、シナプス結合した神経細胞間の機能的伝達を調べるための有効な技術であり、1個のシナプス前細胞のみが刺激されているので、シナプス協力作用や神経伝達物質蓄積から生じる影響は回避されている。本研究では、正確な单シナプス伝達特性を解析するため、ラット海馬スライス培養標本を用いて、CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞の連絡細胞対記録を行った。

### 方法

#### スライス培養

全ての実験は、生後 5-7 日のラット仔から作成したスライス培養を行った。本動物実験は、神戸大学大学院医学研究科・動物実験委員会によって承認されている(許可番号:P130808)。厚さ 400  $\mu\text{m}$  の内嗅皮質-海馬スライス切片を、凝固二ワトリ血漿(Japan Biostest, Saitama, Japan)でカバーガラスに固定し、血清を含む培地で試験管に密封し、回転インキュベーターにより 36 度で 14-21 日間、培養した。

#### 電気生理学

スライス培養標本を、正立顕微鏡(AxioExaminer, Zeiss, Jena, Germany)に設置された記録チャンバーに移し、外液 (148.8 mM  $\text{Na}^+$ , 2.7 mM  $\text{K}^+$ , 149.2 mM  $\text{Cl}^-$ , 2.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 2.0 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 11.6 mM  $\text{HCO}_3^-$ , 0.4 mM  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , 5.6 mM D-glucose and 10 mg  $\text{l}^{-1}$  phenol red; pH 7.4) を 34 度で灌流した。EPC10 増幅器(HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)を使用し、パッチ電極(2-5 M $\Omega$ )で、海馬 CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞から記録した。電極は、内液(135 mM K-gluconate, 5 mM KCl, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA, 2 mM Mg-ATP, 5 mM creatine phosphate, 0.4 mM GTP, 0.07 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mg  $\text{l}^{-1}$  biocytin; pH 7.2)で満たした。活動電位は、0.1 Hz で脱分極電流を(1ms, 3.2 nA)注入し、誘発した。電気信号は、10 kHz でフィルターした後、PATCHMASTER ソフトウェア(HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany)を用いてデジタル記録し、ハードディスクに保存した。本文中の数値データは平均±標準誤差として表わした。

#### ビオシン標識

記録細胞を標識するため、0.1% ビオシン(Life Technologies, NY, USA)をピベット内液に加えた。実験後、スライスを 4% パラホルムアルデヒド緩衝液中で固定し、ジアミンベンチジンを用いたアビシン - ビオチンペルオキシダーゼ複合体(Vector Laboratories, CA, USA)として可視化した。

### 結果

#### 単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の特性

CA1 野と海馬支脚との境界は、CA1 錐体細胞層の急な拡大により同定し、細胞層内の海馬支脚主細胞の密度が CA1 野錐体細胞のそれよりも低いことを確認した。記録は、境界から  $100 \mu\text{m}$  離れた CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞から行い、46 個の海馬支脚主細胞と 71 個の CA1 野錐体細胞の記録から、23 組のシナップス連絡した細胞対を記録し得、その確率は 32.4% であった。それらの中で、20 組は解析に適するものであった。20 組の細胞対の海馬支脚主細胞は、脱分極電流注入に応答して定律に活動電位を発生した。単一シナップス活動電位が CA1 野錐体細胞に惹起されると、経過の速い内向き電流が海馬支脚主細胞に誘発された。これらの速い内向き電流は、AMPA/カイニン酸受容体阻害剤、CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ) 投与により完全に阻害された ( $n=12$ )。単位興奮性シナップス後電流 (EPSC) の単シナップス性は、活動電位のピークとシナップス後応答開始の間の潜時の変動が小さいこと（標準偏差  $0.85 \pm 0.01 \text{ ms}$ ,  $n=20$ ）や、高頻度刺激の際も一对一伝達であることで確認された。活動電位を  $0.1 \text{ Hz}$  で惹起したとき、シナップス後応答の不成功率は低かった ( $0.08 \pm 0.02$ ,  $n=20$ )。単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の平均振幅は  $44.1 \pm 7.6 \text{ pA}$  であった ( $n=20$ )。単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> に、外向き抑制性シナップス後電流 (EPSC<sub>Sub→CA1</sub>) は伴わなかった。単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> は記録されても、CA1 野錐体細胞に単シナップス応答 (EPSC<sub>Sub→CA1</sub>) は認められず ( $n=20$ )。CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞の間に相互のシナップス結合が形成される可能性は少ないものと考えられた。

#### CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞間の単シナップス伝達のペアパルス抑圧

二つのシナップス活動電位を  $50 \text{ ms}$  未満の間隔で惹起したところ、二番目の単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> は、最初のものと比較して、抑圧された。ペアパルス比 (PPR) は、第一 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅に対する第二 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅の比として計算すると、間隔が  $50 \text{ ms}$  未満では、ペアパルス比が有意に減少した。（ $25 \text{ ms}$  の間隔で  $0.61$ ,  $P<0.01$ ;  $10 \text{ ms}$  の間隔で  $0.46$ ,  $p<0.01$ ;  $100 \text{ ms}$  の間隔でのデータから、フィッシャーの最小有意差検定を行った。 $n=16$ ）。

#### 高頻度刺激での単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の周波数依存性

CA1 野錐体細胞が高頻度で活動電位を発生する時、シナップス伝達がどのように調節されるかを調べるため、 $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $100 \text{ Hz}$  の異なる頻度で 10 個の活動電位を誘発させ、海馬支脚主細胞での単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> を記録した。活動電位の頻度を増加すると、単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅は減少した。1 番目の EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅に対する 10 番目の EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅の比率は  $10 \text{ Hz}$  で  $0.87 \pm 0.09$ 、 $20 \text{ Hz}$  で  $0.55 \pm 0.08$ 、 $40 \text{ Hz}$  で  $0.31 \pm 0.06$ 、 $100 \text{ Hz}$  で  $0.20 \pm 0.07$  であった ( $n=20$ )。

#### 討論

先行研究により、海馬 CA1 野から海馬支脚間のシナップスに関する機能特性の報告はあるが、これらの研究では、細胞外電極で複数のシナップス前入力を刺激して、シナップス応答記録が行われている。本研究では、CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞の連絡細胞対からのパッチクランプ記録により、単位単シナップス興奮電流 (EPSC<sub>CA1→Sub</sub>) の正確な特性を初めて解析した。

EPSC<sub>CA1→Sub</sub> は安定に活動電位により惹起され、伝達不成功率 ( $0.08$ ) がシャッファー側枝 EPSC の不成功率 ( $0.53$ ) や苔状線維 EPSC の不成功率 ( $0.83$ ) より低かった。また、EPSC<sub>CA1→Sub</sub> のペアパルス比 ( $50 \text{ ms}$  間隔で  $0.84$ ) はシャッファー側枝 EPSC や、苔状線維 EPSC のペアパルス比よりも小さかった。このことから、CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞間のシナップスは、2 つの主要な海馬のグルタミン酸作動性シナップス、苔状線維シナ

プスとシャッファー側枝シナップスよりもグルタミン酸放出確率が高いことが示された。CA1 野錐体細胞は生体内で、 $1 \text{ Hz}$  未満の周波数で活動電位を発生するが、単シナップス EPSC<sub>CA1→Sub</sub> で抑制性シナップス応答は検出されなかつた ( $n=20$ ) ことからも、海馬支脚への各々の情報は内嗅皮質などの下流領域に安定に伝えられるものと考えられる。

動物が場所フィールドに入ると、CA1 野錐体細胞は断続的なバーストとして  $40 \text{ Hz}$  に至る高周波数で活動電位を発生することが報告されている。EPSC<sub>CA1→Sub</sub> は、CA1 野錐体細胞の  $10 \text{ Hz}$  より高い周波数での活動電位によって、抑圧された。シナップスは、神経伝達物質放出の活動依存性制御により神経細胞間の情報の流れを制御する。すなわち、神経伝達物質放出確率の低い促進シナップスは、ハイパスフィルターとして機能し、神経伝達物質放出確率の高い抑圧シナップスは、ローパスフィルターとして機能する。CA1 野から海馬支脚へのシナップス伝達の、安定性と周波数に依存した制御は、海馬支脚が、高頻度の信号を海馬外に伝播するのを防ぐローパスフィルターとして機能する可能性を示唆しており、海馬支脚の機能やその精神神経疾患の病因への関与を明らかにするため、さらなる検討が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 2539 号	氏名	耿 濩奇
論文題目 Title of Dissertation	<p>Monosynaptic excitatory transmission from the hippocampal CA1 region to the subiculum (海馬 CA1 野から海馬支脚への単シナプス 興奮性伝達)</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 寺島俊雄印 Chief Examiner</p> <p>副査 木見本香枝 Vice-Examiner</p> <p>副査 古屋敦輔之 Vice-Examiner</p>		
審査終了日	平成 27 年 9 月 24 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

## 【初めに】

海馬支脚は空間記憶と動機付けに重要な役割を果たし、側頭葉てんかん、アルツハイマー病や統合失調症などの精神神経疾患の病因に関与している。海馬支脚主細胞は、CA1 野錐体細胞からの入力を受け、CA1 野錐体細胞と共に場所細胞として空間情報の処理を行っている。機能的な観点では、海馬支脚は CA1 野や CA3 野などの他の海馬領域に比べ、なお明らかにされていないことが多い。本研究では、正確な単シナプス伝達特性を解析するため、ラット海馬スライス培養標本を用いて、CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞の連絡細胞対記録を行った。

## 【方法】

生後 5-7 日のラット仔から作成した、内嗅皮質 - 海馬スライス培養標本を記録チャンバーに移し、標準タイロード溶液で灌流し、グルコン酸カリウム内液で満たしたパッチ電極で、海馬 CA1 野錐体細胞と海馬支脚主細胞からパッチクランプ記録した。記録細胞を標識するため、0.1% ビオシンを電極内液に加え、記録後、スライスを 4% パラホルムアルデヒド緩衝液中で固定し、アビシン - ビオチンペルオキシダーゼ複合体として可視化した (DAB 法)。

## 【結果】

CA1 野と海馬支脚との境界は、CA1 錐体細胞層の急な拡大により同定し、46 個の海馬支脚主細胞と 71 個の CA1 野錐体細胞の記録から、23 組のシナプス連絡した細胞対を記録できた。それらの中で、20 組は解析に適するものであった。単一シナプス活動電位が CA1 野錐体細胞に惹起されると、経過の速い内向き電流が海馬支脚主細胞に誘発され、保持電位 -70 mV での振幅は  $44.1 \pm 7.6 \text{ pA}$  であった。活動電位を 0.1 Hz で惹起した時のシナプス後応答の不成功率は低かった ( $0.08 \pm 0.02$ )。二つのシナプス活動電位を 50 ms 未満の間隔で惹起すると、ペアパルス比が有意に減少、抑圧され (25ms の間隔で 0.61)、CA1 野錐体細胞から海馬支脚主細胞へのシナプス伝達は、伝達物質放出確率の高いシナプスであることが示された。CA1 野錐体細胞に、10、20、40、100Hz の異なる頻度で 10 個の活動電位を惹起し、海馬支脚主細胞で単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> を記録すると、活動電位の頻度の増加に伴い、単位 EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅は減少した。1 番目の EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅に対する 10 番目の EPSC<sub>CA1→Sub</sub> の振幅の比は 40Hz で  $0.31 \pm 0.06$  であった。

## 【考察】

先行研究により、海馬 CA1 野から海馬支脚間のシナプスに関する機能特性に関する報告はあるが、これらの研究では、細胞外刺激電極でシナプス応答記録が行われ、入力特異

性が低い。本研究で、CA1野錐体細胞と海馬支脚主細胞の連絡細胞対からのパッチクランプ記録により、単位単シナプス興奮電流 (EPSC<sub>CA1→Sub</sub>) の正確な特性を初めて解析した。EPSC<sub>CA1→Sub</sub>は安定に活動電位により惹起され、伝達不成功率 (0.08) が海馬シャッファー側枝 EPSC の不成功率 (0.53) や苔状線維 EPSC の不成功率 (0.83) より低かった。また、EPSCCA1→Sub のペアパルス比 (50ms 間隔で 0.84) はシャッファー側枝 EPSC や、苔状線維 EPSC のペアパルス比よりも小さかった。このことから、CA1野錐体細胞と海馬支脚主細胞間のシナプスは、2つの主要な海馬のグルタミン酸作動性シナプスである苔状線維シナプスとシャッファー側枝シナプスよりもグルタミン酸放出確率が高いことが示された。CA1野錐体細胞は生体内で、1Hz未満の頻度で活動電位を発生するが、単シナプス EPSC<sub>CA1→Sub</sub>で抑制性シナプス応答は検出されなかったことからも、海馬支脚への各々の情報は内嗅皮質などの下流領域に安定に伝えられるものと考えられる。一方、動物が場所フィールドに入ると、CA1野錐体細胞は断続的なバーストとして 40 Hz に至る頻度で活動電位を発生することが報告されている。EPSC<sub>CA1→Sub</sub>は、CA1野錐体細胞での 10Hz より頻度の多い活動電位によって、抑圧された。シナプスは、神経伝達物質の放出を活動依存性に調節することにより、神經細胞間の情報の流れを制御する。すなわち、神經伝達物質放出確率の低い促通シナプスは、ハイパスフィルターとして機能し、神經伝達物質放出確率の高い抑圧シナプスは、ローパスフィルターとして機能する。CA1野から海馬支脚へのシナプス伝達の安定性と入力頻度に依存した調節は、海馬支脚が高頻度の信号を海馬外に伝播するのを防ぐローパスフィルターとして機能する可能性を示唆しており、海馬支脚の機能やその精神神経疾患の病因への関与を明らかにするため、さらなる研究が必要である。

### 【結語】

本研究は、シナプス前ニューロンの刺激によるシナプス後ニューロンのシナプス高電位をパッチクランプ法による対記録 paired recording により調べたもので、海馬支脚が低いパスフィルターとして機能することにより、高頻度信号が海馬外に伝わること防ぐ具ことを買いらかにした。これらの研究成果は海馬支脚の新しい機能を示した点において価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。